

Gefriergetrocknetes Plasma – Renaissance eines Klassikers



Prof. Dr. med. Jürgen Bux
Dr. rer. nat. Albrecht Hoburg
Dieter Dickhörner
Dr. rer. nat. Edgar Scheel

DRK-Blutspendedienst West, Hagen

Zusammenfassung

Die Anwendung von Plasma ist indiziert bei komplexen Gerinnungsstörungen und Faktorenmangelzuständen, bei denen keine Faktorenkonzentrate zur Verfügung stehen. In der jüngsten Vergangenheit zeigte sich, dass die Schwere, insbesondere die Letalität, der akuten posttraumatischen Koagulopathie durch frühzeitige Gabe von Plasma signifikant reduziert werden kann. Dies hat u.a. zu einer Renaissance des gefriergetrockneten Plasmas geführt, das im Gegensatz zum gefrorenen Frischplasma bei Kühl- und Raumtemperatur (Temperaturbereich +2°C bis +25°C) gelagert werden kann und innerhalb kurzer Zeit wiederaufgelöst ist. Proteomuntersuchungen, Tierversuche, Hämovigilanzdaten und klinische Untersuchungen zeigen, dass die Gefrier Trocknung ein schonendes Verfahren darstellt, dass gefriergetrocknetes Plasma zur Behandlung der akuten Koagulopathie geeignet ist und dass bislang keine Unterschiede in der Wirksamkeit und Verträglichkeit zum gefrorenen Frischplasma beobachtet wurden.

Summary

Plasma is indicated in complex coagulopathies and isolated deficiencies of coagulation factors and inhibitors of which concentrates are not available. Recent studies showed that severity and especially mortality of trauma-associated coagulopathies can be significantly reduced by early infusion of plasma. Amongst others, this has led to a renaissance of the freeze-dried plasma which can be stored either refrigerated or at room temperature (range +2°C – +25°C) and which can be resolved within a few minutes. Proteomics, animal studies, haemovigilance data and clinical studies showed that lyophilisation is a gentle procedure, that freeze-dried plasma is suitable for treatment of acute trauma-associated coagulopathies and that no differences have been observed so far in the clinical efficacy and compatibility of freeze-dried plasma compared to fresh frozen plasma.

Einleitung

Die Gabe von Plasma ist indiziert bei komplexen Gerinnungsstörungen und isolierten Faktorenmangelzuständen, für die keine Faktorenkonzentrate zur Verfügung stehen. Hierzu gehören u.a. die disseminierte intravasale Gerinnung, Blutungen bei Leberparenchymerkrankungen mit nachgewiesener Koagulopathie, die thrombotisch-thrombozytopenische Purpura (TTP, Substitution von vWF:CP = ADAMTS13), Faktor V- und XI-Mangelzustände sowie Verlust- und Verdünnungskoagulopathien bei Operationen und Verletzungen (1). Traumata sind heute die Haupttodesursache bei Personen im Alter zwischen 5 und 45 Jahren (2). Untersuchungen in den letzten Jahren bei Verletzten infolge von Unfällen oder militärischen Auseinandersetzungen haben gezeigt, dass bis zu 34% der Traumapatienten mit einer klinisch signifikanten akuten Koagulopathie eingeliefert werden und diese - verglichen mit Patienten ohne Koagulopathie - ein signifikant höheres (bis zu vierfaches) Letalitätsrisiko aufweisen (3,4,5). Das Transfusionsverhältnis von Plasma zu Erythrozytenkonzentraten zeigte sich mit dem Überleben assoziiert (odds ratio 8,6, 95% Vertrauensintervall 2,1 - 35,2), wobei ein Plasma / EK -Verhältnis von >1:1,5 mit einer geringeren Letalität bzw. besserem



Überleben verbunden war (6,7). Zur Prävention der traumabedingten akuten Koagulopathie wird deshalb zunehmend die frühzeitige Gabe von Plasma empfohlen (8). Der Verfügbarkeit von Plasma kommt damit wachsende Bedeutung zu.

Gefrorenes Frischplasma (GFP) muss vor seiner Anwendung einem kontrollierten qualitätsgesicherten Auftauprozess in einem speziell zugelassenen Auftaugerät unterzogen werden, der in dafür spezialisierten Einrichtungen (Labor, Blutbank) durchgeführt wird. Vorteilhaft ist daher ein Plasmapräparat, das nur gekühlt oder besser bei Raumtemperatur gelagert und innerhalb weniger Minuten am Anwendungsort transfusionsbereit gemacht werden kann. Schon während des zweiten Weltkrieges sammelte man deshalb erste Erfahrungen mit der Gefrier Trocknung



(Lyophilisation) von Blutplasma (9). Zur effizienten Lyophilisation mussten jedoch damals die Plasmaspenden von ca. tausend Spendern zusammengeführt werden. Hepatitisinfektionen von mehr als tausend Empfängern waren die Folge. Die aufwändige Anlagentechnik sowie steigende Anforderungen an Hygiene und Prozessführung führten dazu, dass die Herstellung von gefriergetrocknetem Plasma entweder aufgegeben oder nie begonnen wurde. In Ostdeutschland wurde nach der Wiedervereinigung das in der DDR noch gebräuchliche Trockenplasma verlassen, so dass gefriergetrocknetes Plasma in Deutschland heute nur noch vom DRK-Blutspendedienst West hergestellt und unter dem Namen LyoPlas N – w abgegeben wird.

Das Plasma für LyoPlas N – w stammt aus einer Einzelspende. LyoPlas N – w kann gekühlt oder bei Raumtemperatur, d.h. in einem Temperaturbereich von +2°C bis +25°C gelagert werden. Es gelten die gleichen Anwendungsgebiete wie für konventionelles gefrorenes Frischplasma. Die Auflösung des Plasmapulvers durch das beigefügte Wasser für Injektionszwecke geschieht innerhalb weniger Minuten - somit kann es rasch und bedarfsgerecht bereitgestellt werden.

Sicherheit und Verträglichkeit

Über die vorgeschriebenen Prüfungen hinaus wird beim DRK-Blutspendedienst West jede Blutspende auf virale Genomäquivalente für Hepatitis A, Hepatitis B und Parvovirus B19 zusätzlich getestet. Vor der Weiterverarbeitung unterliegen die gewonnenen Plasmen der obligatorischen Quarantänelagerung, d.h. es werden nur Plasmen verwendet, deren Spender nach mindestens 4 Monaten erneut ohne auffälligen Befund auf Infektionsparameter getestet wurden. Im Rahmen der weiteren Verarbeitung durchläuft das Plasma einen Zell-Reduktionsschritt (Filtration), wodurch es im Gegensatz zu konventionellem Gefrierplasma praktisch zellfrei und damit besonders verträglich ist. Bei immunkompromittierten Patienten kann auf eine Bestrahlung verzichtet werden und das Übertragungsrisiko von zell (leukozyten) -assoziierten Erregern wie CMV ist extrem vermindert. Da gerade die Gabe von Plasmen mit einem hohen Risiko für die Auslösung einer transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (TRALI) verbunden ist, werden zur Prävention solcher Reaktionen schon seit 2006 nur Plasmen von Spendern ohne Immunisierungsanamnese oder nach Untersuchung auf leukozytäre Antikörper verwendet (10).

Herstellung

Nach Freigabe des Ausgangsplasmas am Ende der Quarantänelagerung werden die tiefgefrorenen

Schritte bei der Herstellung von LyoPlas N – w

Auftauen von quarantänelagerten Einzelplasmen



Steriles Überführen des Plasmas in Glasflaschen



Spinfrieren



Gefriertrocknung

Abbildung 1

Ergebnisse der gerinnungsphysiologischen Stichprobenkontrolle, Mittelwerte \pm SD

Parameter	Ergebnis nach Herstellung (n = 576)	Ergebnis nach 12 Monaten (n = 234)	Referenzbereiche (18)
aPTT	39,0 \pm 1,34	39,7 \pm 0,24	27 – 40 s
Protein S	73,3 \pm 4,85	73,1 \pm 5,49	60 – 124 %
F VIII	0,87 \pm 0,20	0,84 \pm 0,14	0,5 – 1,49 IE/ml

Table 1

Einzelplasmen unter kontrollierten Bedingungen aufgetaut und in einem patentierten geschlossenen System steril vom Plasmabeutel in die Glasflasche überführt (**Abbildung 1**). Hierbei trennt ein integrierter Filter noch im Plasma vorhandene Blutzellen und Zelltrümmer ab. Der gesamte Prozess verläuft EDV-gesteuert und -überwacht. Die mit Plasma gefüllten Flaschen werden verschlossen und zur Vorbereitung auf die Gefriertrocknung auf unter -30°C tiefgefroren („Spinfrieren“). Anschließend wird dem Produkt unter schonenden Bedingungen im Vakuum bei stufenweiser Erhöhung der Temperatur von -45°C auf $+5^{\circ}\text{C}$ über mehrere Tage sämtliches Wasser durch Sublimation entzogen. Etikettierung und Konfektionierung schließen die Herstellung ab. Entsprechend der EU Richtlinie zur Guten Herstellungspraxis finden alle kritischen Herstellungsschritte in Reinräumen statt und werden umfangreich kontrolliert sowie dokumentiert.

Qualität und Stabilität

Neben den In-Prozess-Kontrollen wird eine umfangreiche Qualitätskontrolle (Gerinnungsparameter, pH, Restfeuchte etc.) an festgelegten Stichproben des Endproduktes un-

mittelbar nach der Herstellung und nach einer Lagerung von 12 Monaten durchgeführt. Alle Ergebnisse (**Table 1**) entsprechen den pharmazeutischen Vorgaben sowie den Anforderungen der Richtlinien der Bundesärztekammer zur Gewinnung von Blut und Blutbestandteilen und zur Anwendung von Blutprodukten (**11**). Da es sich um Plasma aus Einzelspenden handelt, liegen die biologischen Aktivitäten der Komponenten innerhalb der physiologischen Schwankungsbreite. Die Sterilität wird ebenfalls an einer Stichprobe nach der Herstellung überprüft.

Umfangreiche Stabilitätsuntersuchungen bei verschiedenen Lagerungstemperaturen gemäß den ICH-Richtlinien (International Conference on Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (**12**)) zeigen, dass LyoPlas N – w weit über die derzeit vom Paul-Ehrlich-Institut zugelassene Haltbarkeit von 12 Monaten hinaus stabil ist (**Abbildung 2**).

Vergleichende qualitative und quantitative Plasmaproteom-Untersuchungen mittels zweidimensionaler Differenz-Gelelektrophorese von 600 Proteinspots vor und nach

Gefriertrocknung bzw. SD (solvent detergent) - Pathogeninaktivierung zeigten, dass die Gefriertrocknung im Gegensatz z.B. zur SD-Behandlung keinen nachweisbaren Einfluss auf die Proteinstruktur hat, wohingegen die SD-Behandlung signifikante Veränderungen an 38 Spots zur Folge hatte, u.a. an den Proteinen α -Antitrypsin, α 1-Antichymotrypsin und α 2-Antiplasmin (**13**). Aktivitätsverminderungen letzterer Proteine sind für die SD-Behandlung bekannt. Bei der Lyophilisation handelt es sich somit um ein vergleichsweise sehr schonendes Verfahren.

Anwendung

Das mitgelieferte Wasser für Injektionszwecke und das gefriergetrocknete Plasma sollen bei der Auflösung etwa Raumtemperatur haben (**Abbildung 3**). Zur Auflösung darf das Plasma nur leicht geschwenkt und nicht geschüttelt werden – Schaumbildung ist zu vermeiden. Wenn alle festen Anteile aufgelöst sind, ist das Plasma zur Anwendung bereit. LyoPlas N – w ist nach dem Lösen zur umgehenden Anwendung bestimmt. Es kann innerhalb von



Abbildung 2

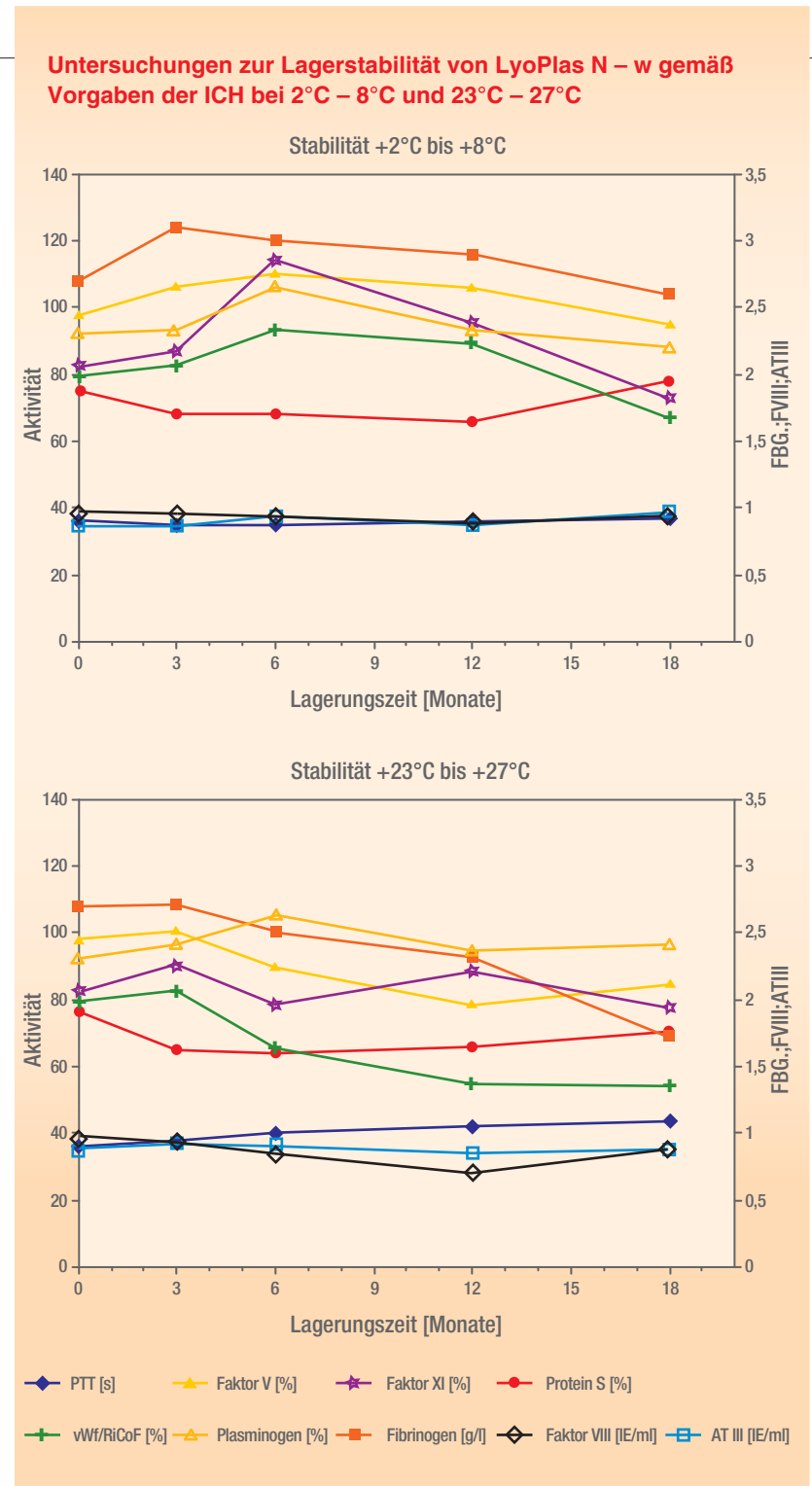
Dargestellt sind Mittelwerte von drei Pools bestehend jeweils aus 15 Einzelplasmen

sechs Stunden ohne Aktivitätsverluste transfundiert werden. Zur Transfusion ist gemäß Richtlinie der Bundesärztekammer ein belüftbares Transfusionsgerät mit Standardfilter (170 – 230 µm) zu verwenden.

Klinische Erfahrungen

Für gefriergetrocknetes Plasma gelten die gleichen Indikationen wie für gefrorenes Frischplasma. In den vergangenen Jahren wurden über 400.000 Einheiten gefriergetrocknetes Plasma in Verkehr gebracht. Das Hämovigilanzregister des DRK-Blutspendedienstes West hat bis heute keine speziellen oder gehäuft auftretende bekannte Plasma-Nebenwirkungen verzeichnet. Dies ist nicht überraschend, da auf Grund der Entfernung von Restzellen durch Filtration und den frühzeitig ergriffenen Maßnahmen zur Prävention der transfusionsassoziierten akuten Lungeninsuffizienz (nur Plasma von männlichen oder auf Leukozytenantikörpern untersuchten Spendern) davon ausgegangen werden kann, dass das gefriergetrocknete Plasma besonders gut verträglich ist.

Einschränkungen in der klinischen Wirksamkeit gegenüber gefrorenem Frischplasma sind bislang nicht bekannt geworden, wofür auch die ver-



gleichbaren Gerinnungsparameter sprechen. In einer thailändischen Studie wurde gefriergetrocknetes Plasma und gefrorenes Frischplasma - aus Kostengründen kamen Faktorenkonzentrate nicht zum Einsatz - zur Therapie von Blutungen bei 11 Patienten mit Hämophilie A

eingesetzt. Gefriergetrocknetes Plasma wurde bei 16, gefrorenes Frischplasma bei 12 Blutungsereignissen verabreicht. In allen Fällen kam es zum Blutungsstillstand, wobei das Faktor VIII-Inkrement dreißig Minuten nach Transfusion von gefriergetrocknetem Plasma $14,1 \pm 5,3$ %

Vorbereitung von LyoPlas N – w zur Transfusion



Abbildung 3

Zur Rekonstitution werden die Schutzkappen von den Flaschen entfernt und die Flaschenstopfen desinfiziert.

Das Transfer Set wird zuerst in die Wasser für Injektionszwecke-Flasche eingestochen, dann mit der anderen Seite in die Plasmaflasche, dabei ist letztere zunächst oben.

Nach dem Umdrehen kann das Wasser vollständig in das Lyophilisat überführt werden. Die Flasche wird zur Transfusion am ausklappbaren Bügel des Etiketts aufgehängt.

und nach gefrorenem Frischplasma $12,1 \pm 3,7\%$ betrug **(14)**. In Südafrika wurde gefriergetrocknetes Plasma bei 46 Patienten mit kardiopulmonaler Bypass-operation ohne Nebenwirkungen eingesetzt **(15)**. In kürzlich in den USA durchgeführten Tierversuchen an Schweinen mit artifiziiell gesetzten multiplen Traumata (Femurfraktur und Grad V Leberschädigung) und hämorrhagischem Schock (60% Blutverlust mit Koagulopathie, Azidose und Hypothermie) wurde die Studiengruppe mit gefriergetrocknetem Tierplasma und die Kontrollgruppe mit gefrorenem Frischplasma behandelt. Weder beeinträchtigte der Lyophilisationsprozess in dieser Studie die Aktivitäten der Gerinnungsfaktoren in vitro noch zeigten sich in vivo Unterschiede

zwischen gefriergetrocknetem Plasma und gefrorenem Frischplasma in der Effizienz der Beseitigung der Koagulopathie in vivo **(16)**. Gefriergetrocknetes Plasma erwies sich in dieser Studie geeignet zur Behandlung von traumainduzierten akuten Koagulopathien. Dies wird unterstützt durch einen aktuellen Fallbericht vom deutschen Einsatzlazarett in Mazar-e-Sharif, in dem über einen 60-jährigen afghanischen Patienten im traumatisch-hämorrhagischen Schock berichtet wird, dem im Rahmen der erfolgreichen Traumaver-sorgung u. a. 20 Einheiten gefriergetrocknetes Plasma (LyoPlas N – w) verabreicht wurden **(17)**.

Gefriergetrocknetes Plasma kann bei $+2^{\circ}\text{C}$ bis $+25^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.

Es lässt sich bei Raumtemperatur rasch rekonstituieren, weshalb es neue Anwendungsmöglichkeiten insbesondere in der Notfall- und Intensivmedizin eröffnet. Darüber hinaus stellt gefriergetrocknetes Plasma wegen des Wegfalls der aufwändigen Tiefgefrierlagerung bei -30°C und der damit verbundenen zeitraubenden AuftauprozEDUREN für klinische Einrichtungen eine Alternative zum klassischen gefrorenen Frischplasma dar.

Die Literaturhinweise finden Sie im Internet zum Download unter: www.drk.de/blutspende